

論文内容の要旨

論文提出者氏名 足立 孝臣

論文題目

Blockade of death ligand TRAIL inhibits renal ischemia reperfusion injury.

論文内容の要旨

急性腎障害は、その高い死亡率と疾病率のため、大きな健康問題となっている。さらに最近では、急性腎障害後に慢性腎不全へ移行する患者が少なからず存在することが問題視されている。しかし現時点では急性腎障害を改善し、さらに腎予後を改善する治療は提唱されていない。急性腎障害の主な原因は多岐にわたるが、その中で高頻度なものと虚血再還流障害 (Ischemia Reperfusion Injury: IRI) が挙げられる。腎 IRI は動物モデルで多く研究がなされており、TNF スーパーファミリーが急性腎障害の病態形成に重要な役割を果たすことが知られている。TNF スーパーファミリーの一員である TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は、分子量 20kDa のリガンド蛋白であり、主にデスレセプター5 (DR5) に結合し、カスパーゼ8・カスパーゼ3の活性化をきたし細胞をアポトーシスへ誘導する。このシグナルカスケードは正常細胞には生じず、炎症環境下や悪性腫瘍においてのみ観察され注目されている。腎臓内科分野では、糖尿病性腎症において TRAIL の発現亢進を認め、治療標的として期待されている。しかし、急性腎障害における TRAIL の役割は不明である。

今回、我々は、マウス腎 IRI モデルを作製し、急性腎障害における TRAIL の関与を解析した。マウス種は FVB/N 雄マウスを用い、全身麻酔下に開腹し、血管クランプを用いて左腎動脈を 60 分間途絶させた。60 分間の血流途絶後クランプを解除し、腎 IRI モデル (IRI 群) を作製した。血流途絶を行わず同様の手技を行ったものを比較対照群 (シャム群) とした。腎 IRI 後 1 日、3 日、28 日で障害腎を採取し以下の解析を行った。

尿細管障害は、細胞の平低化、空胞化および基底膜からの脱落を調べ点数化した。尿細管障害は腎 IRI 後 1 日目には認め、3 日後にピークに達した。その後尿細管障害は改善に向かったが、腎 IRI28 日後において、腎重量およびネフロン数の減少を認め、腎萎縮に陥った。TRAIL mRNA は、IRI 後 1 日目において、シャム群に比べて IRI 群で明らかに発現上昇をリアルタイム RT-PCR にて認めた。同時期の免疫染色では、IRI 群にのみ尿細管上皮細胞の細胞質に TRAIL の発現を認めた。TRAIL のレセプターでありアポトーシス経路を担う DR5 は、TRAIL mRNA と同様、IRI 群において IRI 後 1 日目に明らかな発現上昇をリアルタイム RT-PCR によって認めた。同時期の免疫染色では、IRI 群にのみ尿細管上皮細胞に DR5 の発現を認めた。さらに、DR5 が制御するアポトーシス経路の下流因子である cleaved-caspase8 の検出を、ウェスタンブロットにより行った。その結果、IRI 群にお

いて IRI 後 1 日目に、有意な cleaved-caspase8 の上昇を認めた。以上より、腎 IRI における TRAIL シグナル経路の活性化を確認した。

続いて、中和抗体による TRAIL 阻害実験を以下のように行い、TRAIL 阻害効果を解析した。中和抗体は、腎 IRI24 時間前に、一個体当たり 500 μ g を腹腔内投与し、さらに腎 IRI 直後に一個体当たり 250 μ g を腹腔内投与した。対照群に対しては、中和抗体と同種のコントロール IgG を、同様のプロトコルで投与した。IRI 後 3 日目の尿細管障害は、TRAIL 抗体投与群では対照群と比較して明らかな障害度の改善を認めた。また、IRI 後 1 日目の尿細管アポトーシスについて TUNEL 法にて検討した結果、抗体投与群において有意な TUNEL 陽性細胞数の減少を認めた。また、抗体投与群で cleaved-caspase8 は有意に減少していた。IRI 後 1 日目の炎症性サイトカイン・ケモカインである TNF α , IL-2b, MCP-1, MIP-2 をリアルタイム RT-PCR により検討したところ、これらは全て抗体投与群で有意に減少していた。また、抗体投与群では MPO 免疫染色により、IRI 後 1 日において有意に好中球浸潤の減少を認めた。また、IRI 後 3 日目における有意なマクロファージ浸潤の減少を、F4/80 免疫染色により認めた。最後に、TRAIL 阻害による腎萎縮への影響について検討した。対照群では、IRI28 日後において腎臓は萎縮し、重量減少とネフロン数減少を認めたが、抗体投与群では腎萎縮を認めず、重量減少やネフロン数減少は認めなかった。マッソントリクローム染色により線維化の評価を行ったところ、対照群では組織学的に尿細管構造の減少と間質の線維化を認めたが、抗体投与群では著明に改善した。以上より TRAIL 中和抗体は急性腎障害後に起こる腎萎縮をも改善したことが示された。

TNF α ・FasL・TWEAK といった他の TNF スーパーファミリーの関与は報告されていたが、本研究において初めて TRAIL が腎 IRI の病態形成に関与することを示した。また、中和抗体を用いた TRAIL 阻害実験により、腎 IRI 後のアポトーシス・炎症を抑制し、尿細管障害を抑制することを証明した。腎 IRI では、その障害進展に尿細管細胞自体のアポトーシス、および炎症が重要であることが知られているが、本研究により TRAIL 阻害はその双方を抑制し、結果として腎障害を改善しうることを明らかにした。さらに、TRAIL 阻害により急性腎障害後の腎萎縮を抑制しうることを示したことによって、TRAIL 阻害が急性腎障害のみならず腎予後を改善する可能性が示された。